



**Eur päisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02016244.2

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE, 17/03/03
LA HAYE, LE



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.:
Application no.: 02016244.2
Demande n°:

Anmeldetag:
Date of filing: 22/07/02
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
Roche Diagnostics GmbH
68305 Mannheim
GERMANY
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
4070 Basel

SWITZERLAND
Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:

Konjugat aus einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase und Dextran, Verfahren zur
Herstellung und Verwendung

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:

/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing:
Etats contractants désignés lors du dépôt:

AT/BG/BE/CH/CY/CZ/DE/DK/EE/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

22 Juli 2002

Case 21323 EP

**Konjugat aus einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase und Dextran,
Verfahren zur Herstellung und Verwendung.**

Gegenstand der Erfindung ist ein Konjugat aus einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase und Dextran, ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Konjugates und ihre Verwendung.

Alkalische Phosphatasen (AP, EC 3.1.3.1) gehören zu einer ubiquitär verbreiteten Familie
5 dimerer Metalloenzyme, die unter alkalischen Bedingungen die Hydrolyse von
Phosphatmonoestern unter Freisetzung von anorganischem Phosphat katalysieren
(McComb et al. (1979), Alkaline Phosphatases, Plenum Press, New York). Im Menschen
können vier Isoenzyme unterschieden werden: i) die Placenta-spezifische AP, ii) die
Keimzellen-spezifische (Placental)-AP, iii) die Intestinal-AP und iv) die
10 gewebeunspezifische AP (tns-AP) (Harris, H., Clin Chim Acta 186 (1990) 133-50). Die tns-
AP wird am stärksten in der Leber (LAP), der Niere (KAP) und den Knochen (BAP)
gebildet (Moss, D. W., Clin Chem 38 (1992) 2486-92) und ist die am häufigsten vertretene
AP-Isoform im Serum (Mulivor, R. A., et al., J Lab Clin Med 105 (1985) 342-8). LAP, KAP
und BAP unterscheiden sich aufgrund unterschiedlicher posttranslationaler O-
15 Glykosilierungsmuster voneinander (Miura, M., et al., Ann Clin Biochem 31 (1994) 25-30),
was sich auch in unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten niederschlägt (Nosjean, O., et
al., Biochem J 321 (1997) 297-303) sind jedoch in ihrer Aminosäuresequenz im
wesentlichen identisch (Weiss, M. J., et al., J Biol Chem 263 (1988) 12002-10). Zudem
wiesen Nosjean et al. nach, dass die N-Glykosilierung der tns-AP essentiell für die
20 enzymatische Aktivität ist. Gewebsunspezifische AP ist demzufolge ein Gemisch von
unterschiedlichen glycosilierten APs.

Das Gen für die humane tns-AP konnte bereits 1986 kloniert werden (Weiss, M. J., et al.,
Proc Natl Acad Sci U S A 83 (1986) 7182-6). Es kodiert für ein aus 524 Aminosäuren
bestehendes Protein mit einer 17 Aminosäuren langen N-terminalen Signalsequenz sowie
25 einer C-terminalen GPI-Anker-Sequenz, mit der das Protein in vivo auf der Außenseite der
Plasmamembran verankert ist (Hooper, N. M., Clin Chim Acta 266 (1997) 3-12). Obschon
also die DNA-Sequenz der humanen tns-AP länger bekannt ist, wurde bislang lediglich
über die Expression eines rekombinanten, biologisch aktiven Enzyms in eukaryotischen
Zellen wie z. B. COS-1 (Fukushi, M., et al., Biochem Biophys Res Commun 246 (1998)

613-8) oder Baculovirus-infizierten Insektenzellen (Oda, K., et al., J Biochem (Tokyo) 126 (1999) 694-9) berichtet.

Die heterologe Expression von Proteinen in Prokaryonten wie z. B. *Escherichia coli* ist eine häufig verwendete Technologie zur sicheren und kostengünstigen Herstellung rekombinanter Proteine. Die Expression eukaryontischer Proteine in Prokaryonten weist dabei zwei Charakteristika auf: i) Prokaryonten wie z. B. *E. coli* führen eine Reihe von für Eukaryonten typische posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Glykosilierungen nicht durch und ii) in Prokaryonten exprimierte eukaryotische Proteine liegen häufig in Form schwer löslicher, biologisch inaktiver Proteinaggregate (Inclusion Bodies, IBs) vor (Makrides, S. C., Microbiol Rev 60 (1996) 512-38, Balbas, P., Mol Biotechnol 19 (2001) 251-67). Letztere können mit bekannten Methoden (Lilie, H., et al., Curr Opin Biotechnol 9 (1998) 497-501) in eine enzymatisch aktive Form zurückgeführt werden. Dazu werden die IBs zunächst durch Zugabe eines chaotropen Agens wie z.B. Harnstoff in Lösung gebracht, und durch Dialyse oder durch Verdünnung in einem chaotrop-freien Puffer naturiert. Im Stand der Technik wird ein Verfahren zur Renaturierung einer Placenta-spezifischen alkalischen Phosphatase beschrieben (US 5,434,067).

Obwohl die physiologische Rolle der alkalischen Phosphatase weitgehend unbekannt ist, gehört die Bestimmung ihrer enzymatischen Aktivität zu den Routineuntersuchungen in der klinischen Diagnostik. Eine Veränderung der AP-Aktivität im Serum gilt als diagnostischer Marker für eine Vielzahl von klinischen Erscheinungsbildern, wie z.B. Hypo- oder Hyperphosphatasias (Silve, C., Curr Opin Rheumatol 6 (1994) 336-9), Erkrankungen der Leber, der Gallenwege sowie Sepsis (Maldonado, O., et al., J Clin Gastroenterol 27 (1998) 342-5, Wiwanitkit, V., BMC Fam Pract 2 (2001) 2) oder auch Knochenerkrankungen (Romagnoli, E., et al., Clin Chem Lab Med 36 (1998) 163-8). Im Serum liegt ein heterogenes Gemisch der verschiedenen Formen der AP vor. Wie bereits angeführt, variiert auch das Verhältnis von LAP, KAP und BAP, die zusammen die tns-AP bilden, von Patient zu Patient, da das Verhältnis der einzelnen Formen der AP im Serum abhängig ist von Art und Schwere der individuellen Erkrankung der Patienten.

Aus diesem Grund ist es schwierig, geeignete Referenz- bzw. Standardproben zur Verfügung zu stellen. Üblicherweise werden Serum pools aus Seren von Patienten mit AP Normalwerten und erhöhten AP-Werten verwendet, aber auch Präparationen normaler LAP oder BAP kommen zum Einsatz. Die für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase in humanem Serum oder Plasma verwendeten Referenzproben stammen auch aus tierischen Quellen wie Rind oder Schwein, aus humanen Zelllinien oder der humanen Placenta. Dies birgt verschiedene Nachteile in sich: Die Isolierung von Enzymen aus tierischen oder humanen Geweben ist mit einer hohen Infektionsgefahr (HIV, BSE) verbunden und technisch sehr aufwendig. Aufgrund fehlender Alternativen empfiehlt die International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) z. Zt. die Verwendung einer aus Schweinenieren isolierten tns-AP als Referenzenzym (Tietz, N. W., et al., J Clin Chem Clin Biochem 21 (1983) 731-48).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es eine Präparation einer AP zur Verfügung zu stellen, die als Referenz in der klinischen Diagnostik verwendet werden kann und reproduzierbar und einfach herzustellen ist.

Gegenstand der Erfindung ist ein Konjugat einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (tns-AP) und Dextran erhältlich durch Reaktion von unglykolysierter tns-AP mit aktiviertem Dextran in wässriger Lösung, abstoppen der Reaktion und Isolierung des Konjugates aus der Lösung.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass ein erfindungsgemäßes Konjugat enzymatisch aktiv ist, die Eigenschaften einer tns-AP besitzt und sich deshalb insbesondere als Standard in AP-Tests eignet. Darüber hinaus ist die gemessene AP Aktivität des erfindungsgemäßen Konjugates im Reagenz, welches von der IFCC empfohlen wird (Tietz et al., supra), nicht wesentlich von der Pufferkonzentration abhängig.

IFCC Reagenz und Reaktionsbedingungen:

Temperatur	$30 \pm 0.05 \text{ }^{\circ}\text{C}$
pH (30 °C)	10.40 ± 0.05
2-Amino-2-methyl-1-propanol Puffer	$0.35 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
4-Nitrophenylphosphat	$10.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
Magnesiumacetat	$2.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

Zinksulfat	1.0 mmol . l ⁻¹
N-Hydroxyethylethylendiamin-tri-essigsäure (HEDTA)	2.0 mmol . l ⁻¹
Volumen Fraktion der Probe	0.0196 (1:51)

- Überraschenderweise werden im IFCC-Test gleiche Aktivitäten für den erfindungsgemäßen Standard im Pufferbereich von 0,35 - 0.90 mol/l gemessen. In den anderen Eigenschaften verhält sich der erfindungsgemäße Standard im IFCC-Test analog zu einem Kontrollserum.
- 5 Vergleichsversuche zeigen, dass dagegen ein Konjugat aus unglycosylierter tns-AP und Glukose (glukosylierte tns-AP) als Standard ungeeignet ist.

- Unter einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (tns-AP) ist erfindungsgemäß eine alkalische Phosphatase zu verstehen, die in glycosylierter Form aus humaner Leber, Knochen oder Niere isoliert werden kann (EC 3.1.3.1). Die Nukleotidsequenz von tns-AP
- 10 ist beschrieben von Weiss et al., 1986 supra. Tns-APS aus Leber, Knochen und Niere unterscheiden sich gemäß Nosjean et al., supra lediglich in ihrer Glycosylierung, nicht jedoch in der Aminosäuresequenz.

- In einer bevorzugten Ausführungsform wird zu Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugats als unglycosylierte tns-AP eine tns-AP verwendet, die durch rekombinante
- 15 Expression einer für tns-AP kodierende Nukleinsäure in einer prokaryonischen Zelle, vorzugsweise in E. coli und gegebenenfalls nach Naturierung, erhalten werden kann. Derartige Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen in Prokaryonten sind aus dem Stand der Technik bekannt (vgl. Lilie et al., supra).

- Es ist weiter bevorzugt, für das Konjugat ein Dextran mit einem mittleren
- 20 Molekulargewicht von 10 – 500 kDa zu verwenden. Wie sich gezeigt hat, hat allerdings das Molekulargewicht des verwendeten Dextrans nur einen sehr geringen Einfluß auf die erfindungsgemäßen Eigenschaften des Konjugates. Die Kopplung von Dextran an tns-AP kann nach bekannten Verfahren erfolgen. Dabei wird das Dextran zunächst aktiviert, vorzugsweise durch Periodatoxidation von Dextran, Cyanylierung mit CNBr oder
- 25 Aktivierung mit CDAP (1-Cyano-Dimethylaminopyridiniumtetrafluorborat). Anschließend erfolgt die Kopplung durch Inkubation vorzugsweise bei Raumtemperatur (siehe z. B. Andersson, A., et al., Int J Cancer 47 (1991) 439-44; Holmberg, A. and Meurling, L., Bioconjug Chem 4 (1993) 570-3; Lovqvist, A., et al., Cancer Biother 8 (1993) 345-56; Olsson, P., et al., Int J Cancer 56 (1994) 529-37; Sjostrom, A., et al., Int J Cancer 70
- 30 (1997) 383-9). Nach Abstoppen der Reaktion, vorzugsweise mit einem Aminreagenz, kann das Konjugat isoliert werden durch bekannte Reinigungsmethoden, wie z. B.

chromatographische Methoden. Mit diesem Verfahren wird Dextran an die unglycosylierte tns-AP in Zufallspositionen kovalent gebunden, wodurch ein heterogenes Gemisch von Konjugaten aus Dextran und tns-AP entsteht. Die erfindungsgemäße Eignung des Konjugates wird dadurch gewährleistet, dass zur Herstellung reproduzierbare Bedingungen
5 in Bezug auf Temperatur, Aktivierungsreagenz, Verhältnis Aktivierungsreagenz zu Dextran, Verhältnis unglycosylierter tns-AP zu aktiviertem Dextran, mittleres Molekulargewicht des Dextrans, Inkubationszeit und Abstoppreagenz eingehalten werden. Die erfindungsgemäß geeigneten Reaktionsbedingungen sind jedoch in einem weiten Bereich variabel und an sich unkritisch.

10 Vorzugsweise wird die Reaktion bei Raumtemperatur und über etwa eine Stunde durchgeführt. Als Aktivierungsreagenzien werden bevorzugt CDAP oder BrCN verwendet. Das molare Verhältnis Aktivierungsreagenz zu Dextran beträgt vorzugsweise 1:2 bis 1:20.

Es ist bevorzugt, dass für die Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugates aktiviertes Dextran im Überschuß, vorzugsweise im molaren Verhältnis 1:2 bis 1:500, besonders
15 bevorzugt 1:10 bis 1:500 (in Bezug auf die unglycosylierte tns-AP), eingesetzt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Konjugates durch Reaktion von unglycosylierter tns-AP mit aktiviertem Dextran durch Inkubation in wässriger Lösung, abstoppen der Reaktion und Isolierung des Konjugates aus der Lösung. Vorzugsweise beträgt die Dauer der Inkubation etwa 1 Stunde. Das Abstoppen der
20 Reaktion erfolgt vorzugsweise durch Zugabe eines Aminoreagenzes wie beispielsweise Ethanolamid.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird zur Herstellung des erfindungsgemäßen Konjugates unglycosylierte tns-AP verwendet, die durch rekombinante Expression einer für tns-AP kodierende Nukleinsäure in einer prokaryonischen Zelle erhalten wurde.

25 Besonders bevorzugt wird ein Dextran eines mittleren Molekulargewichts von 10 – 100 kDa verwendet, das Dextran mit CDAP aktiviert und für die genannte Reaktion unglycosylierte tns-AP und aktiviertes Dextran im molaren Verhältnis 1:10 bis 1:500 eingesetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer unglycosylierter tns-AP zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Konjugates aus unglycosylierter tns-AP und
30 Dextran.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Konjugates als Standard in einem Verfahren zur quantitativen Bestimmung der alkalischen Phosphatase. Solche Verfahren sind beispielsweise von Tietz et al., supra beschrieben.

Die folgenden Beispiele, Publikationen, das Sequenzprotokoll und die Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Beschreibung der Figuren:

- | | | |
|----|---------|--|
| | Figur 1 | Restriktionskarte humane tns-AP |
| 10 | Figur 2 | Plasmidkarte pBKShuap11 |
| | Figur 3 | Restriktionskarte pelB-APN |
| | Figur 4 | Plasmidkarte pQ Epel BAP |
| | Figur 5 | Rückfaltungskinetik von unglycosylierter tns-AP |
| | Figur 6 | Elutionsprofil von dextranisierter tns-AP |
| 15 | Figur 7 | Aktivitätsprofil von dextranisierter tns-AP (40 kDa)
(x: Ergebnisse mit Kontrollserum; Δ: Ergebnisse mit erfindungsgemäßem Standard) |
| 20 | Figur 8 | Aktivitätsprofil von dextranisierter tns-AP (10 kDa, 40 kDa, 60 kDa, 188 kDa, 400 kDa), controls: Kontrollseren (PNU, PPU) |
| | Figur 9 | Aktivitätsprofil von dextranisierter tns-AP (40 kDa) im Vergleich zu glucosylierter tns-AP, Kontrollseren (PNU, PPU) und nicht modifizierter, unglycosylierter tns-AP (Ab nativ) |

Beispiel 1

Klonierung des humanen tns-AP Gens

Dieser Abschnitt beschreibt die Isolierung und Klonierung des Gens für die humane tns-AP sowie die Konstruktion eines zur Expression in *Escherichia coli* geeigneten Fusionsgens mit
5 einer PelB-Signalsequenz. Alle dazu verwendeten DNA-Amplifizierungs- und Klonierungstechniken sind dem Fachmann wohl vertraut und beschrieben (Sambrook et al.(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA).

Zunächst wurde aus einer humanen Leber-cDNA-Bank mittels der Oligonukleotide apNup
10 (SEQ ID NO: 1) und apCdw (SEQ ID NO: 2) die komplette Gensequenz für die humane tns-AP sowie die unmittelbar benachbarten 5'- und 3'-Bereiche mittels der sg. Polymerasekettenreaktion isoliert (SEQ ID NO: 3 und 4), Fig. 1). Das PCR-Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI verdaut und in einem mit den gleichen Enzymen geschnittenen Expressionsvektor ligiert. Figur 2 zeigt das
15 resultierende Plasmid (pBKShuap11).

Die anschließende Konstruktion des zur Expression verwendeten Fusionsgens erfolgte in drei Schritten: [I] Es wurde ein synthetischer Genabschnitt via Gensynthese konstruiert, der einen PelB-Signalsequenz-kodierenden Bereich mit einem Teil des tns-AP -Gens kodierenden Bereichs (Positionen 102-503 aus SEQ ID NO: 3) fusionierte. Die Synthese
20 erfolgte in einer 3-stufigen PCR-Reaktion mittels acht (SEQ ID NO: 5-12) um 20 bp überlappenden Oligonukleotiden, wobei in der ersten Stufe Genabschnitte aus den Primerpaaren uppel/dwpel (Fragment 1), apn1_up/apn1_dw (Fragment 2), apn2_up/apn2dw (Fragment 3) sowie apn3_up/apn3_dw (Fragment 4) hergestellt wurden. In der zweiten Stufe wurden die Fragmente 1 und 2 als Template zur Synthese des
25 Fragments 5, wobei die Oligonukleotide uppel und apn1_dw als Primer dienten, sowie die Fragmente 3 und 4 als Template zur Herstellung des Fragments 6, wobei die Oligonukleotide apn2_up und apn3_dw als Primer dienten, verwendet. In der dritten Stufe wurden die Fragmente 5 und 6 als Template zur Synthese des finalen synthetischen Gens pelB-AP_N (SEQ ID NO: 13, Fig. 3) eingesetzt, wobei die Oligonukleotide uppel und

apn3_dw als Primer verwendet wurden. Auf jeder der drei Stufen der Synthese wurden identische Mengen an Primer bzw. Fragmenten zur Synthese eingesetzt.

[II] Mittels der Oligonukleotide mhuapQEup (SEQ ID NO: 14) und mhuapQEdw (SEQ ID NO: 15) als Primer wurde in einer Polymerasekettenreaktion mit dem Plasmid gemäß Figure 2 als Template ein Abschnitt des htms-AP-Gens vervielfältigt (bp 102-1561 von SEQ ID NO: 3). Das Oligonukleotid mhuapQEdw entfernt die für die letzten 20 Aminosäuren der htms-AP kodierende Sequenz und fügt dem 3'-Ende des Gens die Sequenz AGATCTTAGTAAGGATCCAGAT (SEQ ID NO: 18) hinzu.

[III] Das synthetische Gen pelB-AP_N wurde mit den Restriktionendonukleasen EcoRI und BstEII, der aus Schritt [II] stammende Genabschnitt mit den Restriktionendonukleasen BstEII und BamHI verdaut und mit dem, mit den Restriktionendonukleasen EcoRI und BamHI verdauten Plasmid pQE60 (Qiagen, Hilden, Deutschland) ligiert. Für die Ligationsreaktion wurden gleiche Mengen der verwendeten DNA-Fragment eingesetzt. Das resultierende Fusionsgen wurde als pelB-tns-AP-deltaGPI (SEQ ID NO: 16 und 17), das entstandene Expressionsplasmid, in dem die Expression des pelB-tns-AP-Fusionsproteins unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren T5-Promotors steht, mit pQEpelBAP (Fig. 4) bezeichnet.

Beispiel 2

Expression des pelB-tns-AP Gens in Escherichia coli

Mit dem Expressionsplasmid aus Beispiel 1 pQEpelBAP wurde E. coli K12 transformiert und der daraus resultierende Stamm in LB-Medium mit Ampicillin kultiviert. Die Expression des pelB-tns-AP-Fusionsproteins erfolgt nach Zugabe von IPTG in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase. Nach einer geeigneten Expressionsphase (3-12 h) werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

Beispiel 3

IB Isolierung, Solubilisierung und Rückfaltung

Puffer 1: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

Puffer 2: 8M Harnstoff, 10 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0

5 Puffer 3: 200 mM Tris-HCl, 40 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 9 mM GSH,
4 mM GSSG, 40 % (w/v) Glycerin, pH 8.0

(DDT: Dithiothreitol, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion)

IB-Isolierung

Das tns-AP-Fusionsprotein wird intrazellulär in zwei Formen gebildet: i) ein geringer
10 Anteil (< 5 %) liegt als lösliches, biologisch aktives Enzym vor, dessen Aktivität mit der von
Bretaudiere & Spillmann ((1984) Methods of Enzymatic Analysis, VCH, 75-82)
beschriebenen Methode erfasst werden kann; ii) der weitaus größte Anteil wird in Form
enzymatisch inaktiver IBs gebildet. Diese IBs müssen vor der Solubilisierung,
Renaturierung, Reinigung und Modifikation des Proteins isoliert werden. Dazu werden die
15 Zellen in Puffer 1 aufgenommen und mittels Hochdruckaufschluß aufgeschlossen. Die IBs
werden danach durch mehrere Zentrifugations- und Waschschritten (in Puffer 1) isoliert.

Solubilisierung

Die Solubilisierung der IBs erfolgt unter ständigem Rühren für 2 Stunden bei
Raumtemperatur in Puffer 2 mit 25 mg IBs (Feuchtgewicht) pro ml Puffer 2. Anschließend
20 wird zur Herstellung eines klaren Solubilitats nicht solubiliertes Protein durch
Zentrifugation entfernt.

Rückfaltung

Die Rückfaltung des Proteins erfolgt in Puffer 3. Dazu wird das klare Solubilisat mit einer
Endkonzentration von 9,6 µg/ml (Proteinbestimmung nach Bradford, Analytical
25 Biochemistry 72 (1976) 248-254) unter ständigem Rühren tropfenweise in Puffer 3

- überführt. Dieser Vorgang (Pulsen) wird 12 mal im Abstand von 24 Stunden wiederholt. Die Bestimmung der Enzymaktivität im Rückfaltungsansatz erfolgt mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat nach der Methode von Bretaudiere & Spillmann ((1984) Methods of Enzymatic Analysis, VCH, 75-82) jeweils 24 h nach Zugabe des klaren Solubilisats; das Ergebnis einer typischen Rückfaltungsreaktion ist in Fig. 5 dargestellt. Der Rückfaltungsansatz wird 24 Stunden nach der letzten Zugabe des klaren Solubilisats zur Entfernung nicht-löslicher Proteinaggregate zentrifugiert, die aktive tns-AP befindet sich danach im Überstand.

Beispiel 4

- 10 **Reinigung und Dextransisierung des pelB-tns-AP-Fusionsgens**

Puffer 4: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0
 2 mM MgCl₂
 0.1 mM ZnCl₂
 100 mM NaCl

- 15 Der die aktive tns-AP enthaltende Überstand aus Beispiel 3 wird zunächst per Ultrafiltration über eine Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Zellulose mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa konzentriert. Um den Verlust von tns-AP durch unspezifische Bindung an die Membran zu vermeiden, kann diese zuvor für 24 h in einer 1% Rinderserumalbuminlösung inkubiert werden.
- 20 Anschließend wird der Ansatz in einer Durchflussdialyse für 24 h gegen Puffer 4 dialysiert. Die Leitfähigkeit des Dialysepuffers wird auf 13,2 mS/cm Leitfähigkeit eingestellt, die Durchflussgeschwindigkeit beträgt 20 Liter Puffer 4/h. Die nach der Dialyse auftretenden Proteinaggregate werden durch Zentrifugation entfernt.

- Das Dialysat wird nun durch eine wie oben bereits beschriebene Ultrafiltration auf ca. ein Zehntel des ursprünglichen Volumens konzentriert. Anschließend wird der Proteingehalt der Lösung und die Aktivität der tns-AP wie beschrieben ermittelt. Das derart vorbehandelte Protein kann dann durch Umsetzung mit Dextran chemisch modifiziert werden.

Dazu wird 1g Dextran T-40 (mittleres Molekulargewicht 40 kDa) in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und auf 4°C abgekühlt. Nach der Zugabe von 200 mg CDAP-Bromid werden der Lösung 800 µl einer 0.6 M Triethanolamin-Lösung tropfenweise zugesetzt. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 1 M KH_2PO_4 auf 8 eingestellt (Lösung 5).

- 5 Zur Dextransierung werden 1.5 mg tns-AP mit 300 µl Lösung 5 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird danach durch Zugabe von 12,5 µl einer 1 M Ethanolaminlösung abgestoppt und erneut für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgt eine 24-stündige Dialyse gegen Puffer 4. Der Erfolg der Dextransierung wird gelchromatographisch an einer TSKG 5000 PWXL-Säule (Tosohaas)
- 10 mit 200 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8.0 als Laufpuffer überprüft; ein typisches Elutionsprofil der tns-AP vor und nach der Dextransierung zeigt Fig. 6. Die enzymatische Aktivität der tns-AP beträgt nach der Dextransierung ca. 70-90 % der Aktivität vor der Dextransierung.

- In analoger Weise wird tns-AP an Dextran mit einem mittleren Molekulargewicht von 40
- 15 kDa, 60 kDa, 188 kDa und 400 kDa gekoppelt.

Beispiel 5

Bewertung der dextransierten tns-AP im klinischen Aktivitätstest

- Die Bewertung des rückgefaltenen, dextransierten Proteins auf seine Eignung als Referenzenzym erfolgt in Form eines Methodenvergleiches in zwei von der International
- 20 Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) publizierten Puffersystemen (Tiez et al. (1983) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21: 731-748). Dieser Test wird mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat bei 37°C durchgeführt. Im Rahmen dieses Methodenvergleiches liegt die Aktivitätskurve eines humanen Serums exakt auf der winkelhalbierenden Gerade des x/y-Diagramms (Abszisse: Aktivität in 350 mM AMP, pH
- 25 10.5; Ordinate 900 mM AMP, pH 10.44), d.h. das im Serum enthaltende AP-Gemisch besitzt in beiden Puffersystemen eine identische enzymatisch-spezifische Aktivität. Ein geeignetes Referenzenzym sollte die idealerweise die gleichen Eigenschaften aufweisen.

Zur Bewertung wird die Aktivität der tns-AP aus Beispiel 4 mit der Aktivität eines Humanserums, der tns-AP aus Beispiel 3 sowie mit einem kommerziellen Kontrollserum (Cfas, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) im beschriebenen Methodenvergleich getestet; die Auswertung erfolgt auf einem Roche/Hitachi-Analyzer

5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Typische Bewertungsprofile sind in Figur 7 und 8 wiedergegeben: Das Aktivitätsprofil der dextranisierten tns-AP ist deckungsgleich mit dem des humanen Serums und liegt auf der winkelhalbierenden Gerade des x/y-Diagramms, d.h. beide Proben weisen in beiden Puffern die gleiche Aktivität auf. Somit erfüllt die dextranisierte tns-AP die Anforderungen an ein ideales Kontrollenzym.

10 Dabei hat das Molekulargewicht des verwendeten Dextrans offensichtlich kein Einfluß auf das Aktivitätsprofil. Dagegen liegen sowohl die nicht-dextranisierte als auch das kommerzielle Kontrollserum unterhalb der winkelhalbierenden Gerade, was nicht den Anforderungen an einen idealen Kallibrator entspricht (Figur 9).

Referenzliste

- Andersson, A., et al., Int J Cancer 47 (1991) 439-44
- Balbas, P., Mol Biotechnol 19 (2001) 251-67
- Fukushi, M., et al., Biochem Biophys Res Commun 246 (1998) 613-8
- 5 Harris, H., Clin Chim Acta 186 (1990) 133-50
- Hooper, N. M., Clin Chim Acta 266 (1997) 3-12
- Holmberg, A. and Meurling, L., Bioconjug Chem 4 (1993) 570-3
- Lilie, H., et al., Curr Opin Biotechnol 9 (1998) 497-501
- Lovqvist, A., et al., Cancer Biother 8 (1993) 345-56
- 10 Makrides, S. C., Microbiol Rev 60 (1996) 512-38
- Maldonado, O., et al., J Clin Gastroenterol 27 (1998) 342-5
- Miura, M., et al., Ann Clin Biochem 31 (1994) 25-30
- Moss, D. W., Clin Chem 38 (1992) 2486-92
- Mulivor, R. A., et al., J Lab Clin Med 105 (1985) 342-8
- 15 Nosjean, O., et al., Biochem J 321 (1997) 297-303
- Oda, K., et al., J Biochem (Tokyo) 126 (1999) 694-9
- Olsson, P., et al., Int J Cancer 56 (1994) 529-37
- Romagnoli, E., et al., Clin Chem Lab Med 36 (1998) 163-8
- Sambrook, J., et al., in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
- 20 Silve, C., Curr Opin Rheumatol 6 (1994) 336-9
- Sjostrom, A., et al., Int J Cancer 70 (1997) 383-9
- Tietz, N. W., et al., J Clin Chem Clin Biochem 21 (1983) 731-48
- 25 Weiss, M. J., et al., J Biol Chem 263 (1988) 12002-10
- Weiss, M. J., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 83 (1986) 7182-6
- Wiwanitkit, V., BMC Fam Pract 2 (2001) 2

US 5,434,067

Patentansprüche

EPO - Munich
67
22 Juli 2002

1. Konjugat einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (tns-AP) und Dextran
erhältlich durch Reaktion von unglykolysierter tns-AP mit aktiviertem Dextran in
wässriger Lösung, Abstoppen der Reaktion und Isolierung des Konjugates aus der
Lösung.
5
2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als unglycosylierte tns-AP
eine tns-AP verwendet wird, die durch rekombinante Expression einer für tns-AP
kodierende Nukleinsäure in einer prokaryonischen Zelle erhalten wurde.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Dextran eines
mittleren Molekulargewichts von 10 – 500 kDa verwendet wird.
10
4. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates durch Reaktion von unglykolysierter tns-
AP mit aktiviertem Dextran durch Inkubation in wässriger Lösung, abstoppen der
Reaktion und Isolierung des Konjugates aus der Lösung.
5. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates nach Anspruch 4 dadurch
gekennzeichnet, dass als unglycosylierte tns-AP eine tns-AP verwendet wird, die
durch rekombinante Expression einer für tns-AP kodierende Nukleinsäure in einer
prokaryonischen Zelle erhalten wurde.
15
6. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates nach Anspruch 4 oder 5, dadurch
gekennzeichnet, dass ein Dextran eines mittleren Molekulargewichts von 10 – 500
kDa verwendet wird.
20
7. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates nach den Ansprüchen 4 bis 6, dadurch
gekennzeichnet, dass das Dextran mit CDAP oder BrCN aktiviert wird.
8. Verfahren zur Herstellung eines Konjugates nach den Ansprüchen 4 bis 7, dadurch
gekennzeichnet, dass für die genannte Reaktion unglycosylierte tns-AP und
aktiviertes Dextran im Verhältnis 1:2 bis 1:500 eingesetzt werden.
25
9. Verwendung eines Konjugates gemäß den Ansprüchen 1 – 3 als Standard in einem
Verfahren zur quantitativen Bestimmung der alkalischen Phosphatase.

10. Verwendung einer unglycosylierten tns-AP zur Herstellung eines Konjugates unglycosylierter tns-AP und Dextran.

EPO - Munich
67
22 Juli 2002

Zusammenfassung

Ein Konjugat einer gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (tns-AP) und Dextran erhältlich durch Reaktion von unglykolysierter tns-AP mit aktiviertem Dextran durch Inkubation in wässriger Lösung abstoppen der Reaktion und Isolierung des Konjugates aus
5 der Lösung ist als Standard zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase geeignet.

EPO - Munich
67
22 Juli 2002

SEQUENCE LISTING

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Konjugat aus einer gewebsunspezifischen alkalischen
Phosphatase und Dextran, Verfahren zur Herstellung und
Verwendung

10 <130> 21323 EP

<140>
<141>

15 <160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
20 <211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
25 <223> Description of Artificial Sequence:primer apNup

<400> 1
cacagaattc tgcattctctg ggctccaggg ataaagcagg tc 42

30 <210> 2
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer apCdw

<400> 2
40 tctggatccg ggccctcaga acaggacgct c 31

<210> 3
<211> 1637
45 <212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hutns-AP, pcr-product

50 <400> 3
gaattctgca tctctgggct ccagggataa agcaggtctt ggggtgcacc atgatttcac 60
cattcttagt actggccatt ggcacctgcc ttactaactc cttagtgcc gagaaagaga 120
aagaccccaa gtactggcga gaccaagcgc aagagacact gaaatatgcc ctggagcttc 180
55 agaagctcaa caccaacgtg gctaagaatg tcatcatgtt cctgggagat gggatgggtg 240

```

tctccacagt gacggctgcc cgcctcctca aggggtcagct ccaccacaac cctggggagg 300
agaccaggct ggagatggac aagttcccct tegtggccct ctccaagacg tacaacacca 360
atgcccagggt ccctgacagc gccggcaccg ccaccgccta cctgtgtggg gtgaaggcca 420
atgaggggac cgtgggggta agcgcagcca ctgagcgctt ccggtgcaac accaccagg 480
5 ggaacgaggt cacctccatc ctgcgctggg ccaaggacgc tgggaaatct gtgggcattg 540
tgaccaccac gagagtgaac catgccaccc ccagcgccgc ctacgcccac tgggtgacc 600
gggactggta ctacagacaac gagatgcccc ctgaggcctt gagccagggc tgaaggaca 660
tcgcctacca gctcatgcat aacatcaggg acattgacgt gatcatgggg ggtggccgga 720
aatacatgta cccaagaat aaaactgatg tggagtatga gagtgcagag aaagccaggg 780
10 gcacgaggct ggacggcctg gacctcgtt acacctggaa gagcttcaaa ccgagacaca 840
agcactccca cttcatctgg aaccgcacgg aactcctgac ccttgacccc cacaatgtgg 900
actacctatt ggggtctcttc gagccggggg acatgcagta cgagctgaac aggaacaacg 960
tgacggaccc gtcactctcc gagatgggtg tgggtggccat ccagatcctg cggagaacc 020
ccaaaggctt cttcttgctg gtggaaggag gcagaattga ccacgggcac catgaaggaa 080
15 aagccaagca ggccctgcat gaggcggtg agatggaccg ggccgtcggg caggcaggca 140
gcttgacctc ctcggaagac actctgaccg tgggtcactgc ggaccattcc cacgtcttca1200
catttggtgg atacacccc cgtggcaact ctatctttgg tctggcccc atgctgagt1260
acacagacaa gaagcccttc actgccatcc tgtatggcaa tgggcctggc tacaaggtgg1320
tgggcggtga acgagagaat gtctccatgg tggactatgc tcacaacaac taccaggcgc1380
20 agtctgctgt gcccctgcgc caccagaccc acggcgggga ggacgtggcc gtcttctcca1440
agggcccat ggcgcacctg ctgcacggcg tccacgagca gaactacgtc cccacgtga1500
tggcgatgc agcctgcatc ggggccaacc tcggccactg tgctcctgcc agctcggcag1560
gcagccttgc tgcaggcccc ctgctgctcg cgctggccct ctaccccctg agcgtcctgt1620
tctgagggcc cggatcc
1637

```

25

<210> 4

<211> 524

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<220>

<223> hutns-AP, protein

35 <400> 4

```

Met Ile Ser Pro Phe Leu Val Leu Ala Ile Gly Thr Cys Leu Thr Asn
  1                      5                      10                      15

```

```

40 Ser Leu Val Pro Glu Lys Glu Lys Asp Pro Lys Tyr Trp Arg Asp Gln
      20                      25                      30

```

```

Ala Gln Glu Thr Leu Lys Tyr Ala Leu Glu Leu Gln Lys Leu Asn Thr
      35                      40                      45

```

```

45 Asn Val Ala Lys Asn Val Ile Met Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val
      50                      55                      60

```

```

Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Leu His His Asn
      65                      70                      75                      80

```

50

```

Pro Gly Glu Glu Thr Arg Leu Glu Met Asp Lys Phe Pro Phe Val Ala
      85                      90                      95

```

```

55 Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Thr Asn Ala Gln Val Pro Asp Ser Ala Gly
      100                      105                      110

```


	Thr	Ala	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	Ala	Asn	Glu	Gly	Thr	Val
			115					120					125			
5	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	Thr	Glu	Arg	Ser	Arg	Cys	Asn	Thr	Thr	Gln	Gly
		130					135					140				
	Asn	Glu	Val	Thr	Ser	Ile	Leu	Arg	Trp	Ala	Lys	Asp	Ala	Gly	Lys	Ser
	145					150					155					160
10	Val	Gly	Ile	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Asn	His	Ala	Thr	Pro	Ser	Ala
					165					170					175	
	Ala	Tyr	Ala	His	Ser	Ala	Asp	Arg	Asp	Trp	Tyr	Ser	Asp	Asn	Glu	Met
				180					185					190		
15	Pro	Pro	Glu	Ala	Leu	Ser	Gln	Gly	Cys	Lys	Asp	Ile	Ala	Tyr	Gln	Leu
			195					200					205			
	Met	His	Asn	Ile	Arg	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Met	Gly	Gly	Gly	Arg	Lys
20		210					215					220				
	Tyr	Met	Tyr	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	Asp	Val	Glu	Tyr	Glu	Ser	Asp	Glu
	225					230					235					240
25	Lys	Ala	Arg	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	Leu	Val	Asp	Thr	Trp
					245					250					255	
	Lys	Ser	Phe	Lys	Pro	Arg	His	Lys	His	Ser	His	Phe	Ile	Trp	Asn	Arg
				260					265					270		
30	Thr	Glu	Leu	Leu	Thr	Leu	Asp	Pro	His	Asn	Val	Asp	Tyr	Leu	Leu	Gly
			275					280					285			
	Leu	Phe	Glu	Pro	Gly	Asp	Met	Gln	Tyr	Glu	Leu	Asn	Arg	Asn	Asn	Val
35		290					295					300				
	Thr	Asp	Pro	Ser	Leu	Ser	Glu	Met	Val	Val	Val	Ala	Ile	Gln	Ile	Leu
	305					310					315					320
40	Arg	Lys	Asn	Pro	Lys	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Ile
					325					330					335	
	Asp	His	Gly	His	His	Glu	Gly	Lys	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu	His	Glu	Ala
				340					345					350		
45	Val	Glu	Met	Asp	Arg	Ala	Val	Gly	Gln	Ala	Gly	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser
			355					360					365			
	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Val	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	Val	Phe	Thr
50		370					375					380				
	Phe	Gly	Gly	Tyr	Thr	Pro	Arg	Gly	Asn	Ser	Ile	Phe	Gly	Leu	Ala	Pro
	385					390					395					400
55	Met	Leu	Ser	Asp	Thr	Asp	Lys	Lys	Pro	Phe	Thr	Ala	Ile	Leu	Tyr	Gly
					405					410					415	

Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu Arg Glu Asn Val Ser
420 425 430

5 Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala Gln Ser Ala Val Pro
435 440 445

Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ser Lys
450 455 460

10 Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His Glu Gln Asn Tyr Val
465 470 475 480

Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly Ala Asn Leu Gly His
15 485 490 495

Cys Ala Pro Ala Ser Ser Ala Gly Ser Leu Ala Ala Gly Pro Leu Leu
500 505 510

20 Leu Ala Leu Ala Leu Tyr Pro Leu Ser Val Leu Phe
515 520

<210> 5
25 <211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Description of Artificial Sequence:primer APN1_up

<400> 5
atccgaagta ctggcgagac caagcgcaag agacactgaa atatgccctg gagcttcaga 60
agctcaacac caacgtggct 80

35

<210> 6
<211> 80
<212> DNA
40 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer APN2_up

<400> 6
ccacagtgaac ggctgcccgc atcctcaagg gtcagctcca ccacaaccct ggggaggaga 60
ccaggctgga gatggacaag 80

45

<210> 7
50 <211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
55 <223> Description of Artificial Sequence:primer APN3_up

<400> 7
cccagggtccc tgacagcgcc ggcaccgcca ccgcctacct gtgtgggggtg aaggccaatg 60
agggcaccgt gggggtaagc 80
5

<210> 8
<211> 80
<212> DNA
10 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer APN1_dw

15 <400> 8
gcgggcagcc gtcactgtgg agacacccat cccatctccc aggaacatga tgacattctt 60
agccacgttg gtgttgagct 80

20 <210> 9
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

25 <220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer APN2_dw

<400> 9
ggcgctgtca gggacctggg cattggtggt gtacgtcttg gagagggcca cgaaggggaa 60
30 cttgtccatc tccagcctgg 80

<210> 10
<211> 80
35 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:APN3_dw

40 <400> 10
caggatggag gtgacctcgt tcccctgggt ggtgttgac cggaacgct cagtggctgc 60
gcttaccccc acggtgcct 80

45 <210> 11
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer uppel

<400> 11
55 cacacagaat tcattaaaga ggagaaatta actatgaaat atctgctgcc aactgctgca 60
gctggtctgc tgctcctggc 80

<210> 12
<211> 81
5 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
10 <223> Description of Artificial Sequence:primer dwpel

<400> 12
gtctcgccag tacttcggat ctttttcttt ttctggaacc agtgccatag cgggctgagc 60
agccaggagc agcagaccag c 81

15 <210> 13
<211> 501
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Description of Artificial Sequence:pelB-AP_N

<400> 13
25 cacacagaat tcattaaaga ggagaaatta actatgaaat atctgctgcc aactgctgca 60
gctggtctgc tgctcctggc tgctcagccg gctatggcac tggttccaga aaaagaaaaa 120
gatccgaagt actggcgaga ccaagcgcaa gagacactga aatatgccct ggagcttcag 180
aagctcaaca ccaacgtggc taagaatgtc atcatgttcc tgggagatgg gatgggtgtc 240
tccacagtga cggctgcccc catcctcaag ggtcagctcc accacaacc tggggaggag 300
30 accaggctgg agatggacaa gttccccctc gtggccctct ccaagacgta caacaccaat 360
gccaggtcc ctgacagcgc cggcaccgcc accgcctacc tgtgtggggg gaaggccaat 420
gagggcaccg tgggggtaag cgcagccact gagcgttccc ggtgcaacac caccagggg 480
aacgaggtca cctccatcct g 501

35 <210> 14
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer
mhuapQEup

45 <400> 14
atatagaatt cttagtgcc gagaaagaga aagaccccaa g 41

50 <210> 15
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
55 <223> Description of Artificial Sequence:primer
mhuapQEdw

<400> 15
atctggatcc ttactaagat ctgcctgccg agctggcagg agcacag 47

5
<210> 16
<211> 1539
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Fusionsgen
pelB-tns-AP-deltaGPI

15 <400> 16
atgaaatatac tgctgccaac tgctgcagct ggtctgctgc tcttggtctgc tcagccggct 60
atggcactgg ttccagaaaa agaaaaagat ccgaagtact ggcgagacca agcgctagag 120
aactgaaat atgccctgga gcttcagaag ctcaacacca acgtggctaa gaatgtcatc 180
atgttcctgg gagatgggat ggggtgtctcc acagtgcagg ctgcccgcac cctcaagggt 240
20 cagctccacc acaaccctgg ggaggagacc aggctggaga tggacaagtt ccccttcgtg 300
gccctctcca agacgtacaa caccaatgcc caggtccctg acagcgccgg caccgccacc 360
gcctacctgt gtggggtgaa ggccaatgag ggcaccgtgg gggtaagcgc agccactgag 420
cggtcccggg gcaacaccac ccaggggaac gaggtcacct ccatcctgcg ctgggccaag 480
gacgctggga aatctgtggg cattgtgacc accacgagag tgaaccatgc cacccccagc 540
25 gccgcctacg cccactcggc tgaccgggac tgggtactcag acaacgagat gcccctgag 600
gccttgagcc agggctgtaa ggacatcgcc taccagctca tgcataacat cagggaacatt 660
gacgtgatca tgggggggtg ccggaaatac atgtaccca agaataaaac tgatgtggag 720
tatgagagt acgagaaagc caggggcacg aggtggagc gcctggacct cgttgacacc 780
tggaagagct tcaaaccgag acacaagcac tcccacttca tctggaaccg cacggaactc 840
30 ctgacccttg acccccacaa tgtggactac ctattgggtc tcttcgagcc gggggacatg 900
cagtacgagc tgaacaggaa caacgtgacg gaccctcac tctccgagat ggtggtggtg 960
gccatccaga tcttgcgga gaaccccaaa ggcttcttct tgctggtgga aggaggcaga 1020
attgaccacg ggcaccatga aggaaaagcc aagcaggccc tgcattgaggc ggtggagatg 1080
gaccggggccg tcgggcaggc aggcagcttg acctcctcgg aagacactct gaccgtggtc 1140
35 actgcgacc attcccacgt cttcacattt ggtggatata cccccctggt caactctatc 1200
tttggctctg ccccatgct gagtgcacac gacaagaagc ccttactgct catcctgtat 1260
ggcaatgggc ctggctacaa ggtggtgggc ggtgaacgag agaattgtct catggtggac 1320
tatgctcaca acaactacca ggcgcagtct gctgtgcccc tgcgccacga gaccacggc 1380
ggggaggagc tggccgtctt ctccaagggc cccatggcgc acctgctgca cggcgctcac 1440
40 gagcagaact acgtcccca cgtgatggcg tatgcagcct gcacggggc caacctcggc 1500
cactgtgctc ctgccagctc ggcaggcaga tcttagtaa 1539

<210> 17
45 <211> 511
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
50 <223> Description of Artificial Sequence:Protein
pelB-tns-AP-deltaGPI

<400> 17
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
55 1 5 10 15

	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Leu	Val	Pro	Glu	Lys	Glu	Lys	Asp	Pro	Lys	
				20					25					30			
5	Tyr	Trp	Arg	Asp	Gln	Ala	Gln	Glu	Thr	Leu	Lys	Tyr	Ala	Leu	Glu	Leu	
			35					40					45				
	Gln	Lys	Leu	Asn	Thr	Asn	Val	Ala	Lys	Asn	Val	Ile	Met	Phe	Leu	Gly	
		50					55					60					
10	Asp	Gly	Met	Gly	Val	Ser	Thr	Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	
	65					70					75					80	
	Gln	Leu	His	His	Asn	Pro	Gly	Glu	Glu	Thr	Arg	Leu	Glu	Met	Asp	Lys	
					85					90					95		
15	Phe	Pro	Phe	Val	Ala	Leu	Ser	Lys	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asn	Ala	Gln	Val	
				100					105					110			
	Pro	Asp	Ser	Ala	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	Ala	
20			115					120					125				
	Asn	Glu	Gly	Thr	Val	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	Thr	Glu	Arg	Ser	Arg	Cys	
		130					135					140					
25	Asn	Thr	Thr	Gln	Gly	Asn	Glu	Val	Thr	Ser	Ile	Leu	Arg	Trp	Ala	Lys	
	145					150					155					160	
	Asp	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Gly	Ile	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Asn	His	
					165					170					175		
30	Ala	Thr	Pro	Ser	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Ser	Ala	Asp	Arg	Asp	Trp	Tyr	
				180					185					190			
	Ser	Asp	Asn	Glu	Met	Pro	Pro	Glu	Ala	Leu	Ser	Gln	Gly	Cys	Lys	Asp	
35			195					200					205				
	Ile	Ala	Tyr	Gln	Leu	Met	His	Asn	Ile	Arg	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Met	
		210					215					220					
40	Gly	Gly	Gly	Arg	Lys	Tyr	Met	Tyr	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	Asp	Val	Glu	
	225					230					235					240	
	Tyr	Glu	Ser	Asp	Glu	Lys	Ala	Arg	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Asp	
				245					250					255			
45	Leu	Val	Asp	Thr	Trp	Lys	Ser	Phe	Lys	Pro	Arg	His	Lys	His	Ser	His	
				260					265					270			
	Phe	Ile	Trp	Asn	Arg	Thr	Glu	Leu	Leu	Thr	Leu	Asp	Pro	His	Asn	Val	
50			275					280					285				
	Asp	Tyr	Leu	Leu	Gly	Leu	Phe	Glu	Pro	Gly	Asp	Met	Gln	Tyr	Glu	Leu	
		290					295					300					
55	Asn	Arg	Asn	Asn	Val	Thr	Asp	Pro	Ser	Leu	Ser	Glu	Met	Val	Val	Val	
	305					310					315					320	

Ala Ile Gln Ile Leu Arg Lys Asn Pro Lys Gly Phe Phe Leu Leu Val
325 330 335

5 Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Gly Lys Ala Lys Gln
340 345 350

Ala Leu His Glu Ala Val Glu Met Asp Arg Ala Val Gly Gln Ala Gly
355 360 365

10 Ser Leu Thr Ser Ser Glu Asp Thr Leu Thr Val Val Thr Ala Asp His
370 375 380

Ser His Val Phe Thr Phe Gly Gly Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Ile
15 385 390 395 400

Phe Gly Leu Ala Pro Met Leu Ser Asp Thr Asp Lys Lys Pro Phe Thr
405 410 415

20 Ala Ile Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Lys Val Val Gly Gly Glu
420 425 430

Arg Glu Asn Val Ser Met Val Asp Tyr Ala His Asn Asn Tyr Gln Ala
435 440 445

25 Gln Ser Ala Val Pro Leu Arg His Glu Thr His Gly Gly Glu Asp Val
450 455 460

Ala Val Phe Ser Lys Gly Pro Met Ala His Leu Leu His Gly Val His
30 465 470 475 480

Glu Gln Asn Tyr Val Pro His Val Met Ala Tyr Ala Ala Cys Ile Gly
485 490 495

35 Ala Asn Leu Gly His Cys Ala Pro Ala Ser Ser Ala Gly Arg Ser
500 505 510

<210> 18
40 <211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide

<400> 18
agatcttagt aaggatccag at

50

Fig. 1

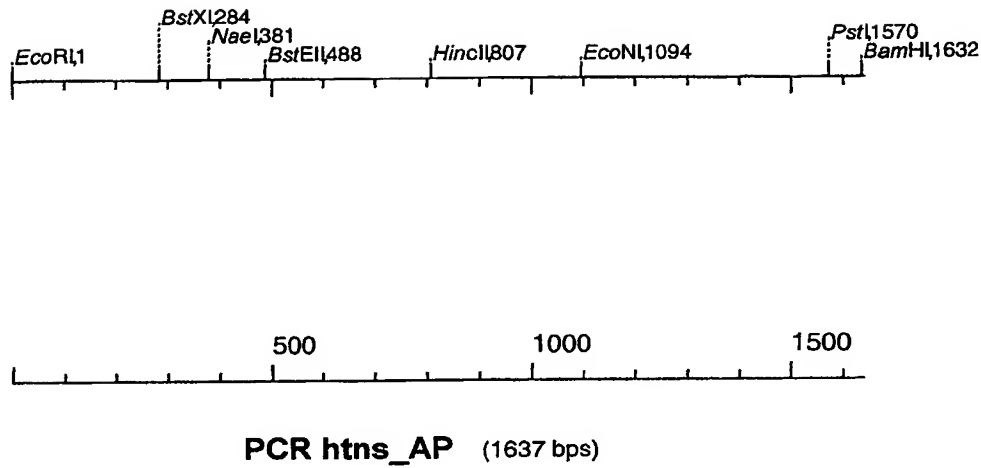


Fig. 2

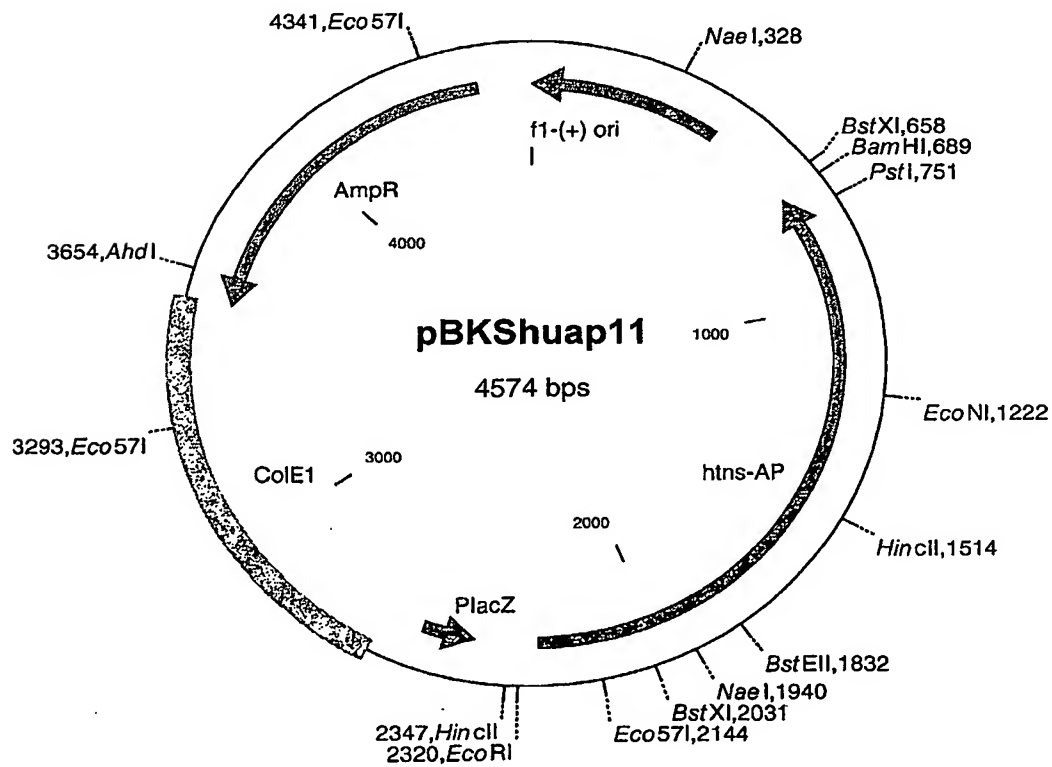


Fig. 3

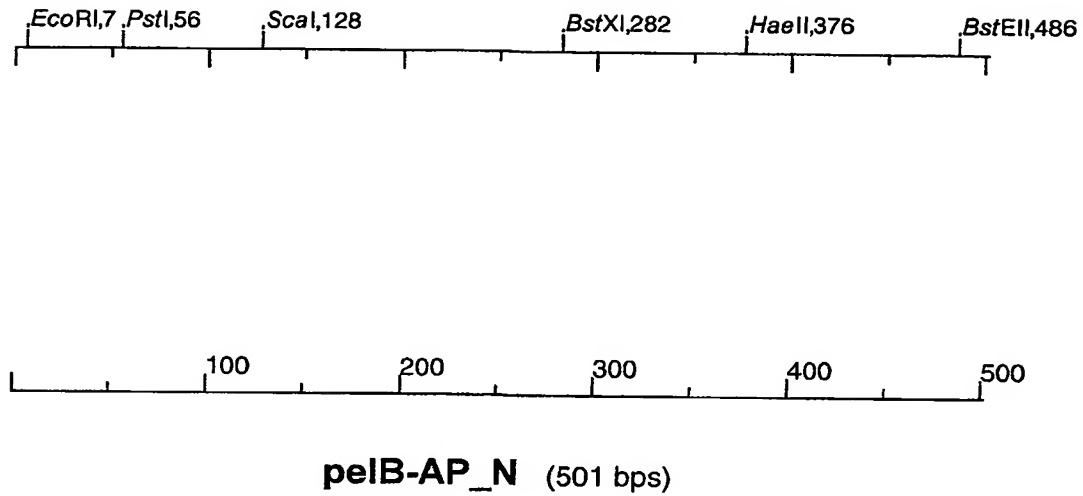


Fig. 4

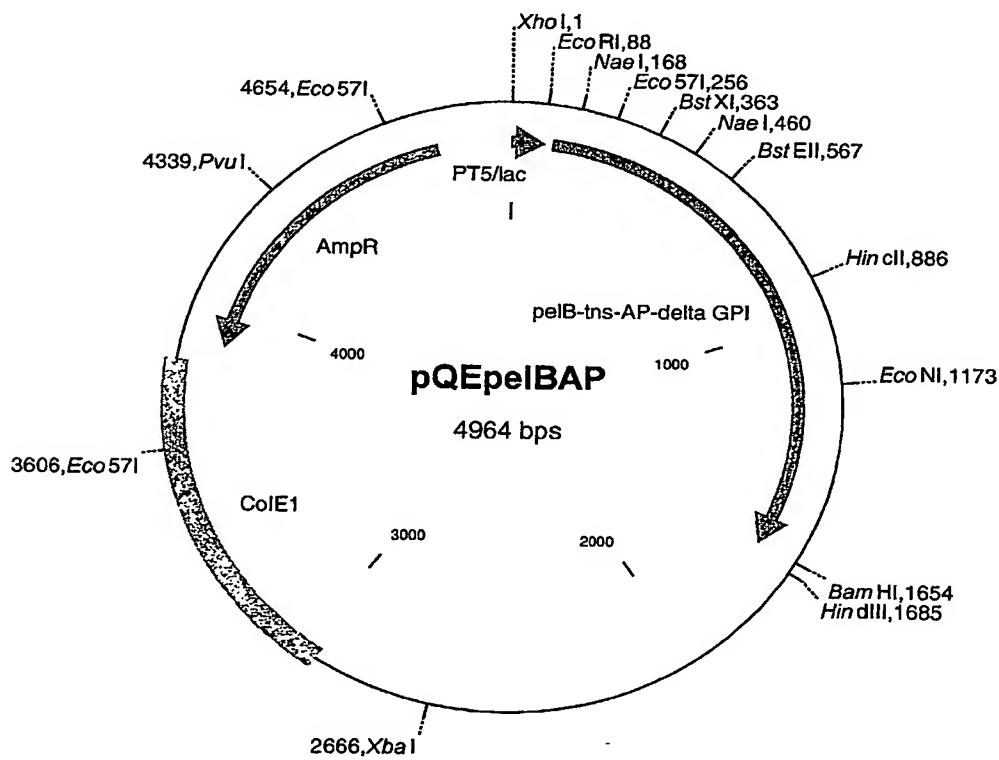


Fig. 5

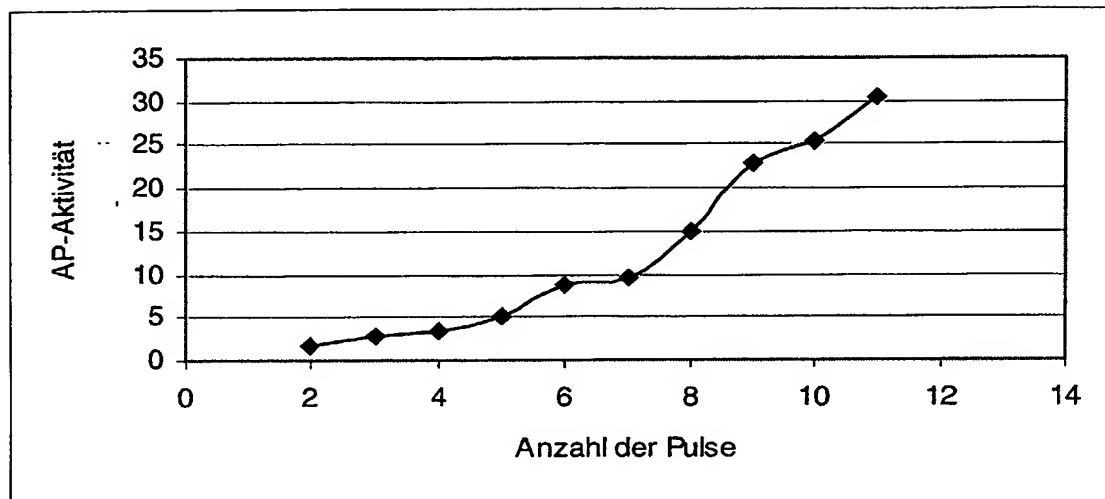


Fig. 6

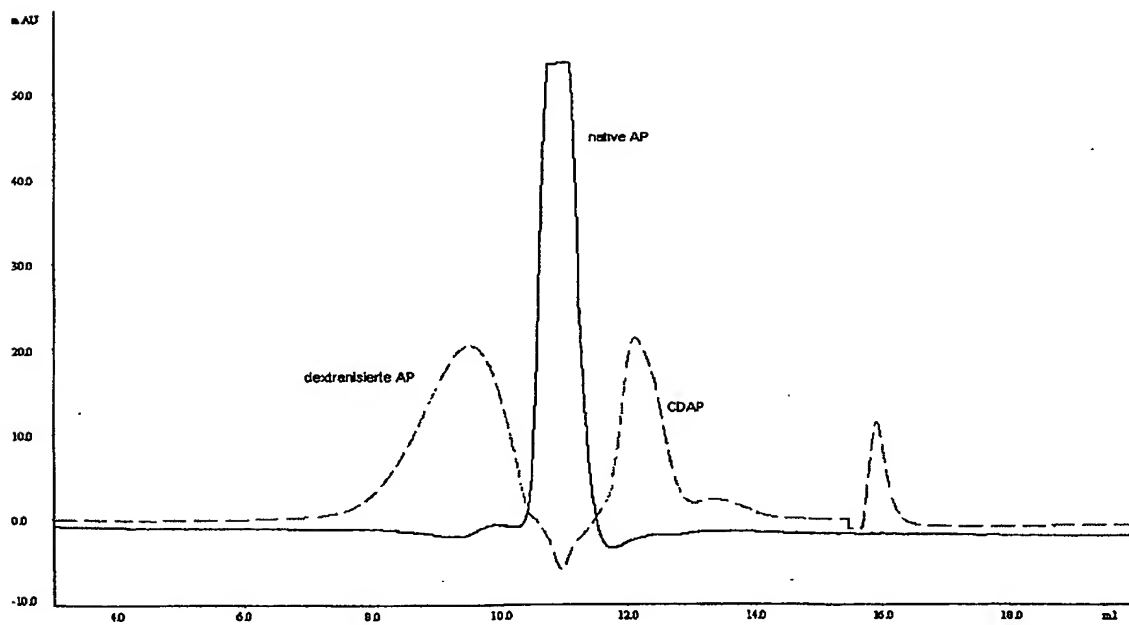


Fig. 7

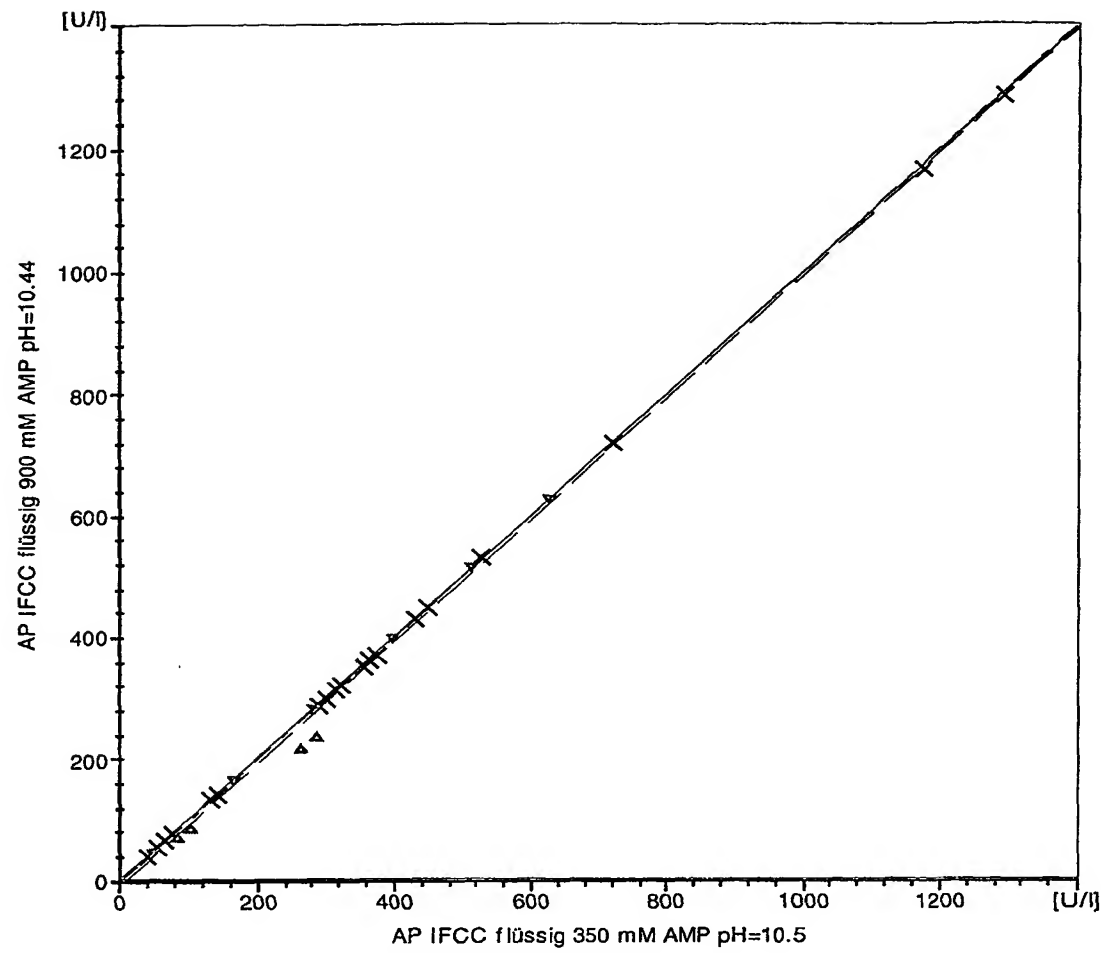
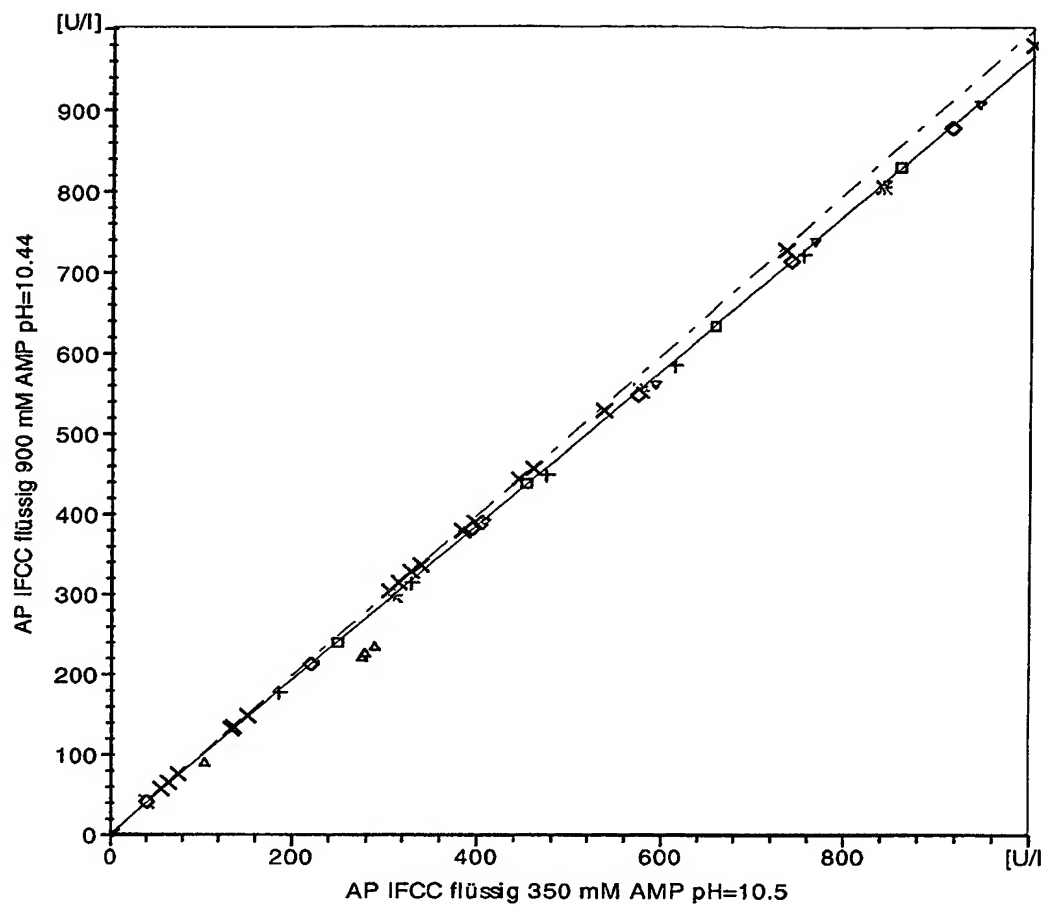
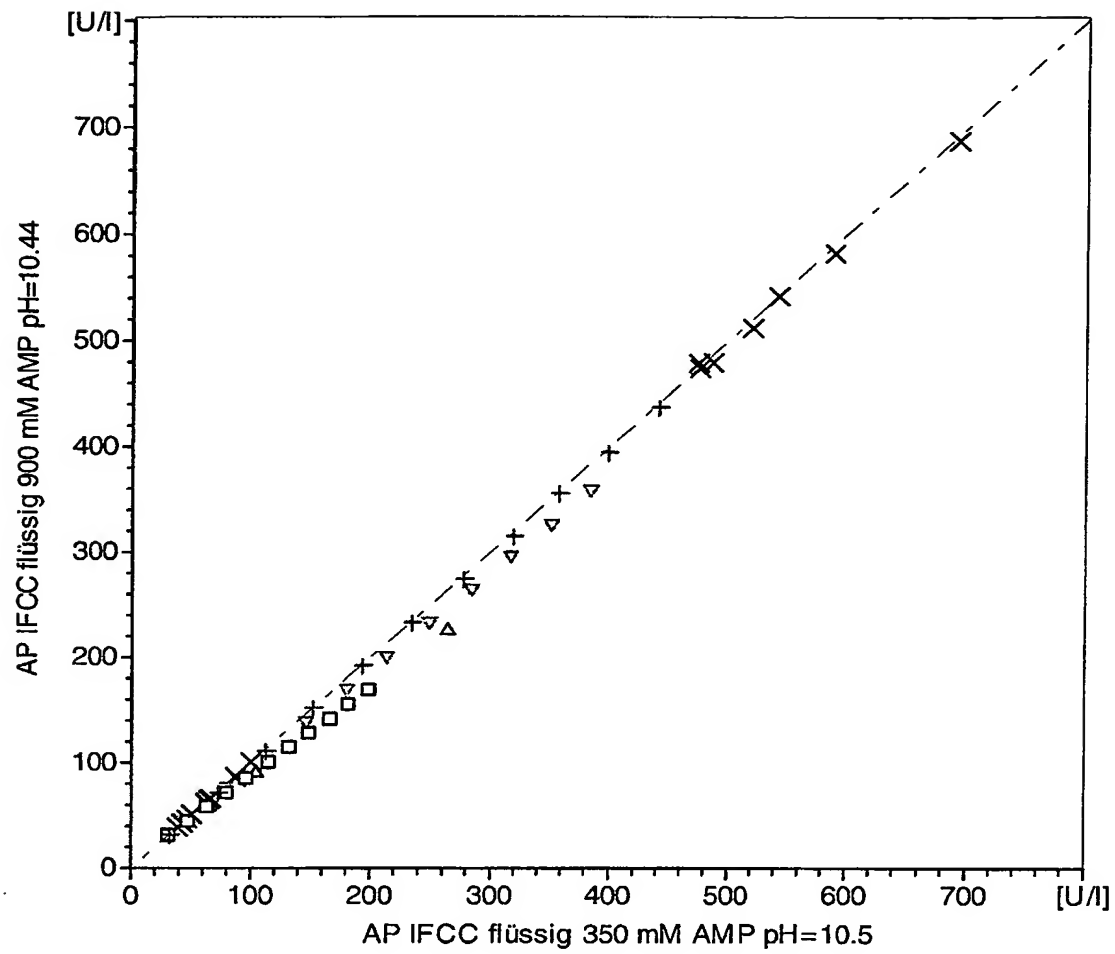


Fig. 8



- × Human sera
- △ Controls
- ▽ AP 1 10000
- AP 2 40000
- † AP 3 60000
- ※ AP 4 188000
- ◇ AP 5 400000

Fig. 9



- × Normalseren
- △ PNU, PPU
- ▽ b-APA03 nativ
- b-APA03 glucosyliert
- + b-APA03 dextranisiert